



1034 B
Atty. Dkt. No 074022-2305

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: NYGREN et al.

Title: DEVICES AND METHODS FOR
OPTICAL DETECTION OF
NUCLEIC ACID
HYBRIDIZATION

Appl. No.: 09/982,658

Filing Date: 10/18/2001

Examiner: Carla J. Myers

Art Unit: 1634

<p>CERTIFICATE OF MAILING</p> <p>I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as First Class Mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, PO Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450, on the date below.</p> <p>Line Gauthier (Printed Name)</p> <p><i>Line Gauthier</i> (Signature)</p> <p>March 18, 2004 (Date of Deposit)</p>
--

TRANSMITTAL

Commissioner for Patents
PO Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

Transmitted herewith for filing in the above-referenced application is a Certified Copy of the German Priority Document, DE 35 06 703.

Although no fees are believed to be due, the Commissioner is hereby authorized to charge any fees which may be required regarding this application under 37 C.F.R. §§ 1.16-1.17, or credit any overpayment, to Deposit Account No. 50-0872.

Respectfully submitted,

Date March 18, 2004

Richard J. Warburg
FOLEY & LARDNER LLP
Customer Number: 30542
Telephone: (858) 847-6717
Facsimile: (858) 792-6773

By *Richard San Pietro*

Richard San Pietro
Attorney for Applicant
Registration No. 45,071



**Europäisches
Patentamt**

**European
Patent Office**

**Office européen
des brevets**

Bescheinigung

Certificate

Attestation


Die angehefteten Unterlagen stimmen mit den in den Akten befindlichen Unterlagen der unten bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein (Regel 94(4) EPU).

The attached is a true copy of documents contained in the European patent application indicated below (Rule 94(4) EPC).

Les documents ci-annexés sont conformes aux documents figurant dans le dossier de la demande de brevet dont le numéro est indiqué ci-dessous (règle 94(4) CBE).

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

86102108.7


C. B. Reising

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag.

For the President of the European Patent Office.

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

München, den
Munich,
Munich, le

04/03/04



Bescheinigung

Die SAGAX Instrument AB in Täby (Schweden) hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Analyse, insbesondere Sequenzanalyse, von Nucleinsäure, insbesondere der Desoxyribonucleinsäure (DNA) oder Ribonucleinsäure (RNA), sowie Träger für die Verwendung bei dieser Analyse und Verfahren zur Herstellung dieses Trägers"

am 26. Februar 1985 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die angeheftete Zusammenfassung, die der Anmeldung beizufügen, aber kein Bestandteil der Anmeldung ist, stimmt mit dem am 26. Februar 1985 eingereichten Original überein.

Der Sitz der Anmelderin wurde berichtigt in Sundbyberg (Schweden).

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig das Symbol G 01 N 33/68 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

P 35 06 703.9

München, den 7. März 1986
Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Kohler

Kohler

LIEDL, NOTH

Patentanwälte

Steinsdorfstr. 21-22 · D-8000 München 22 · Tel. 089/229441 · Telex: 05/22208

11199 - N/Li

SAGAX Instrument AB

Box 2149, S-183 02 Täby, Schweden

Verfahren zur Analyse, insbesondere Sequenzanalyse, von
Nucleinsäure, insbesondere der Desoxyribonucleinsäure (DNA)
oder Ribonucleinsäure (RNA), sowie Träger für die Verwendung
bei dieser Analyse und Verfahren zur Herstellung
_____ dieses Trägers _____

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Analyse, insbesondere Sequenzanalyse, von
Nucleinsäure, insbesondere der Desoxyribonucleinsäure (DNA)
oder Ribonucleinsäure (RNA), bei dem die zu untersuchende
Nucleinsäure auf einem festen Träger für die Analyse immobi-
lisiert wird, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

daß die zu untersuchende flüssige Probe, welche denaturierte Nucleinsäure aufweist, mit einer lichtreflektierenden, einen chemisch gebundenen Nucleinsäurestrang mit bestimmter Sequenz aufweisenden Oberfläche des Trägers in Berührung gebracht wird, auf welcher sich dabei komplementäre Sequenzen der in der Probe vorhandenen denaturierten Nucleinsäure mit dem an der Trägeroberfläche vorhandenen Nucleinsäurestrang durch Hybridisierung vereinigen, und das Dickenwachstum der sich dabei auf der Trägeroberfläche bildenden organischen Schicht optisch, insbesondere aus den durch das Dickenwachstum der organischen Schicht bedingten Änderungen der Reflexionseigenschaften der reflektierenden Trägeroberfläche, bestimmt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n - z e i c h n e t , daß das Dickenwachstum durch ellipsometrische Messung bestimmt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n - z e i c h n e t , daß das Dickenwachstum durch Interferenzmessung bestimmt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 2, d a d u r c h g e k e n n - z e i c h n e t , daß das Dickenwachstum durch Vergleichs-ellipsometriemessung bestimmt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 3, d a d u r c h g e k e n n - z e i c h n e t , daß das Dickenwachstum aus Interferenzänderungen bei der Reflexion von Licht an einer reflektierenden Oberfläche, die eine aus Siliciumoxid und Siliciumdioxid bestehende Doppelschicht aufweist, bestimmt wird.

6. Träger für die Verwendung bei der Analyse, insbesondere Sequenzanalyse, von Nucleinsäure, insbesondere DNA oder RNA, durch Inberührungbringen des Trägers mit der zu untersuchenden nucleinsäurehaltigen Probe, an dessen Oberfläche ein denaturierter Nucleinsäurestrang gebunden ist, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die Trägeroberfläche lichtreflektierend ausgebildet ist, und der eine bestimmte Sequenz aufweisende Nucleinsäurestrang durch chemische Bindung an der Trägeroberfläche haftet.

7. Träger nach Anspruch 6, d a d u r c h g e k e n n - z e i c h n e t , daß der Nucleinsäurestrang durch kovalente Bindung an der Trägeroberfläche haftet.

8. Träger nach Anspruch 6 oder 7, d a d u r c h g e - k e n n z e i c h n e t , daß der Trägerkörper aus Silicium oder Glas besteht.

9. Träger nach einem der Ansprüche 6 bis 8, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß der Trägerkörper an seiner lichtreflektierenden Oberfläche eine Siliciumdioxid- oder Aluminiumoxidschicht aufweist, auf der eine Schicht aus funktionellem Siliciumwasserstoff sich befindet, an welchem der Nucleinsäurestrang kovalent gebunden ist.

10. Träger nach einem der Ansprüche 6 bis 9, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß der Nucleinsäurestrang über eine Polysaccharidzwischenschicht an der reflektierenden Trä-
geroberfläche kovalent gebunden ist.

11. Träger nach Anspruch 9, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß der Siliciumwasserstoff als funktionelle Gruppen Amino- oder Epoxygruppen aufweist.

12. Verfahren zur Herstellung eines Trägers nach Anspruch 6, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß ein eine funktionelle Gruppe aufweisender Siliciumwasserstoff auf die reflektierende Oberfläche des Trägers aufdestilliert wird und anschließend darauf der Nucleinsäurestrang aus einer Puffer-
lösung, in welcher die reine Nucleinsäure gelöst ist, gezüch-
tet wird.

13. Verfahren nach Anspruch 12, d a d u r c h g e k e n n -
z e i c h n e t , daß vor dem Aufbringen des Nucleinsäure-
strangs auf die aktivierte Siliciumwasserstoffschicht durch
Züchtung aus einer wäßrigen Lösung eine Polysaccharidschicht
aufgebracht wird.

Verfahren zur Analyse, insbesondere Sequenzanalyse, von Nucleinsäuren, insbesondere der Desoxyribonucleinsäure (DNA) oder Ribonucleinsäure (RNA), sowie Träger für die Verwendung bei dieser Analyse und Verfahren zur Herstellung

dieses Trägers

Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist ein doppelsträngiges Molekül mit zwei komplementären Ketten aus den vier Nucleotidbasen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin. Die beiden Stränge der DNA sind über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verknüpft, wobei sich bestimmte Basenpaare, nämlich Adenin-Thymin und Cytosin-Guanin zusammenfinden. Die der DNA verwandte RNA enthält Ribose statt Desoxyribose und Uracil statt Thyminresten. Die spezielle DNA-Verknüpfung zu zwei komplementären Ketten führt zu dem genetischen DNA-Code, welcher die genetische Information in allen lebenden Zellen, insbesondere der Chromosomen, darstellt. Bekannte Sequenzen von DNA oder RNA können in der Biotechnologie zur Darstellung der Sequenzen von unbekanntem genetischem Material oder zu Diagnosezwecken zur Identifizierung genetischen Materials aus Viren und Bakterien verwendet werden. Herkömmliche Verfahren zur Bestimmung von DNA- oder RNA-Hybridisierung beruhen auf der Bindung von radioaktiv oder enzymatisch markierten DNA- oder RNA-Sequenzen an komplementärem, einsträngigem DNA oder RNA und nachfolgender Erfassung der Markierung.

Als feste Phasen werden in den meisten Fällen Cellulose oder andere Polysaccharide zur Immobilisierung von DNA verwendet und wirken als Rezeptoren für die markierte DNA-Sonde.

Hierzu ist es beispielsweise bekannt (E. M. Southern J. Mol Biol 98:503 1975), Fragmente der DNA durch Elektrophorese in Agarosegel zu trennen und die getrennten Fragmente zu einzelnen Strängen zu denaturieren, welche durch Diffusion auf Nitrocellulose Teile übertragen werden. Die getrennten Sequenzen werden dann identifiziert durch Inkubation radioaktiv markierter komplementärer Sequenzen, welche an ihre Targets gebunden werden. Das radioaktive Isotop wird dann lokalisiert durch Aktivierung einer photographischen Emulsion. Ferner ist bekannt (B. E. Noyes und G.R. Stark Cell 5:301, 1975), zum gleichen Zweck die denaturierte DNA bzw. RNA kovalent an Cellulose mittels einer Diazobenzylgruppe zu binden.

Sequenzen von DNA aus infektiösen Mikroorganismen können als Sonden verwendet werden zur Erfassung von eventuell vorhandener komplementärer DNA in Proben von Serum, Mark, Fäkalstoffen oder dgl. zu Diagnosezwecken. Bisher werden hierzu radioaktiv

oder enzymatisch markierte Sonden, die bekannte Nucleinsäuresequenzen aufweisen, verwendet.

Aufgabe der Erfindung ist es demgegenüber, ein Verfahren zur Analyse von Nucleinsäuren sowie einen hierfür verwendbaren Nachweisträger und ein Verfahren zur Herstellung dieses Trägers zu schaffen, bei welchen die Durchführung der Analyse, insbesondere Sequenzanalyse, von Nucleinsäuren mit unmarkierten Sonden durchgeführt werden kann.

Diese Aufgabe wird gelöst durch die kennzeichnenden Merkmale der Ansprüche 1, 6 und 12, wobei in den Unteransprüchen Weiterbildungen der Erfindung gekennzeichnet sind.

Bei der Erfindung wird die denaturierte einsträngige DNA bzw. RNA kovalent gebunden auf einer lichtreflektierenden Oberfläche eines Trägers, und dieser Träger wird als Nachweismedium mit der zu untersuchenden Probe, welche denaturierte Nucleinsäure, deren Sequenz zu analysieren ist, in Berührung gebracht. Komplementäre denaturierte Nucleinsäure in der Probe wird an der am Träger vorhandenen, eine bestimmte Sequenz aufweisende einsträngige Nucleinsäure gebunden, wodurch durch optische Messung das Dickenwachstum der sich dabei bildenden organischen Schicht, durch welche insbesondere die Reflexionseigenschaften der reflektierenden Trägeroberfläche verändert werden, nachweisbar ist. Dieser Nachweis kann dadurch

erfolgen, daß Änderungen der Lichtpolarisation nach der Reflexion an der Trägersoberfläche oder Änderungen der Interferenzfarben ermittelt werden. Zur Überwachung des Polarisationsverhaltens kann bevorzugt das in der europäischen Patentschrift 19 088 bzw. in der US-PS 43 32 476 beschriebene ellipsometrische Verfahren sowie die dort beschriebene ellipsometrische Vorrichtung zur Untersuchung der physikalischen Eigenschaften der Oberfläche einer Probe verwendet werden. Für den Nachweis der Änderung der Interferenzfarben des an der Trägersoberfläche reflektierten Lichts infolge der aufgewachsenen organischen Schicht eignet sich ein Trägerkörper, auf dessen reflektierender Oberfläche eine Doppelschicht, nämlich eine Reflexions-Antireflexionsschicht vorhanden ist, auf welcher der Nucleinsäurestrang mit der bekannten Sequenz immobilisiert ist. Als derartiger Trägerkörper eignet sich insbesondere ein solcher, wie er in der DE-OS 32 15 484 beschrieben ist.

Ein geeigneter Trägerkörper, der bei der durchzuführenden Analyse mit der zu untersuchenden Probe als Nachweismedium in Berührung gebracht wird, besitzt bevorzugt eine Silicium- oder Aluminiumoberfläche, auf der ein Siliciumwasserstoff mit einer funktionellen Gruppe als Schicht aufgebracht ist. An dieser Siliciumwasserstoffschicht wird dann der Nucleinsäurestrang mit der bekannten bzw. bestimmten Sequenz durch

chemische Bindung, insbesondere kovalente Bindung, immobilisiert. In vorteilhafter Weise kann noch eine Zwischenschicht aus einem Polysaccharid, insbesondere Dextran, zur Immobilisierung der Nucleinsäure aufgebracht werden.

Von Vorteil ist bei der Erfindung, daß die Nucleinsäuresonden, welche die Nucleinsäure mit bekannter Eigenschaft, insbesondere Sequenz, enthalten, für den nachfolgenden Nachweis nicht mehr markiert werden müssen. Es können bei der Erfindung somit bekannte Proben mit unmarkierten Sonden untersucht werden. Der hierzu erforderliche Trägerkörper läßt sich einfach herstellen und besitzt einen einfachen Aufbau. Die Nachweisreaktion läßt sich in einfacher Weise in einem Vergleichsellipsometer, wie es beispielsweise im europäischen Patent 19088 bzw. in der US-PS 43 32 476 beschrieben ist, durchführen. In dieser Vorrichtung lassen sich komplementäre Sequenzen, die sich an dem auf dem Träger befindlichen Nucleinstrang gebildet haben, visuell sichtbar machen und damit nachweisen und bestimmen. Der Träger wird dabei in der bekannten ellipsometrischen Vorrichtung als Probe eingesetzt. Man benötigt daher bei der Erfindung einen relativ geringen apparativen Aufbau im Gegensatz zu den bislang bekannten Verfahren.

Die reflektierende Trägeroberfläche besteht bevorzugt aus Siliciumdioxid oder Aluminiumoxid. Auf diese ist eine Schicht eines Siliciumwasserstoffs aufgebracht, der eine funktionel-

le Endgruppe enthält. Hierfür eignet sich insbesondere eine Amino(NH_2)- oder eine Epoxy($\text{CH}_2-\text{CH}(\text{O})-\text{CH}_2$)-Gruppe. Die Bindung der Siliciumwasserstoffschicht an der reflektierenden Oberfläche erfolgt spontan an Silanolgruppen bzw. Aluminiumhydroxylgruppen. Die denaturierte Nucleinsäure (DNA bzw. RNA) mit einer bestimmten bekannten Verknüpfungsfolge werden chemisch, insbesondere kovalent, über eine Diazobenzylgruppe direkt an die Siliciumwasserstoffschicht oder über eine Zwischenschicht aus einem Polysaccharid, beispielsweise Dextran, gebunden.

Die Probe wird vor der Analyse denaturiert, beispielsweise in 0,5 M Natriumhydroxid oder dgl. und anschließend neutralisiert, und nachfolgend wird noch ein Hybridisierungspuffer zugegeben, dessen Zusammensetzung eine langsame Verknüpfung der komplementären Nucleinsäurestränge, insbesondere der DNA- bzw. RNA-Stränge ermöglicht. Dieser Puffer kann beispielsweise aus 50 % Formamid, 0,05 M Natriumcitrat, 0,1 % Dodecylsulfat, 1 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) bzw. deren Na-Salz, 0,02 % Albumin und 2 % Dextransulfat bestehen. Die Verknüpfung der komplementären Nucleinsäure aus der Probe mit dem kovalent am Träger immobilisierten Nucleinstrang äußert sich im Anwachsen der Dicke der dabei auf der Träeroberfläche gebildeten organischen Schicht. Nach Spülen mit einer

Kochsalzlösung und Wasser und anschließendem Trocknen läßt sich die Dicke der aufgewachsenen organischen Schicht, wie schon erwähnt, mit Hilfe der Vergleichsellipsometrie (US-PS 43 32 476 oder EP 19 088) oder durch Messung der Änderung der Interferenzfarben von aus Siliciumoxiden bestehenden Doppelschichten an reflektierenden Trägerkörpern, wie sie beispielsweise in der DE-OS 32 15 484 beschrieben sind, ermitteln bzw. messen.

Im folgenden werden Ausführungsbeispiele zur Herstellung eines Trägers, welcher als Nachweismedium bei der Sequenzanalyse von Nucleinsäuren verwendet wird, im einzelnen beschreiben. Diese Träger besitzen eine lichtreflektierende Trägeroberfläche, auf welcher die denaturierte DNA oder RNA durch kovalente Bindung aufgebracht ist.

Beispiel 1

Ein Siliciumplättchen oder Glasplättchen bzw. -scheibchen, auf welches Silicium oder Aluminium beispielsweise durch Aufdampfen aufgebracht ist, wird in einem Exikator angeordnet, der mit einem Einlaßhahn und einem Auslaßhahn versehen ist. Der Druck im Innern des Exsiccators wird auf etwa 10 mm Hg verringert und die Temperatur auf 80 °C gehalten.

Ein Kolben, der Epoxýsiliciumwasserstoff enthält, wird an den Einlaß des Exsiccators angeschlossen, und der Einlaßhahn am Exsiccator wird geöffnet. Der Siliciumwasserstoff wird dabei auf der Oberfläche des mit Silicium bzw. Aluminium beschichteten Silicium- bzw. Glaskörpers durch Destillation aufgebracht, wobei innerhalb von etwa zwei Stunden eine epoxy-aktivierte Oberfläche entsteht. Die beschichteten Körper werden dann in eine Lösung von 12 % 2-Aminothiophenol in Aceton eingetaucht und über einen längeren Zeitraum, etwa 10 Stunden, in einem Inkubator aufbewahrt. Anschließend werden die beschichteten Körper gewaschen und bis zu ihrer weiteren Verwendung in Wasser aufbewahrt. Die beschichteten Körper werden dann in 1 M Salzsäure, welche 250 $\mu\text{g/ml}$ Natriumnitrid aufweist, eine Stunde bei 4 °C eingetaucht, gewaschen und in einer Feuchtekammer aufbewahrt. Isolierte reine DNA wird in 25 mM Phosphatpuffer gelöst, auf 90 °C erhitzt, einem vierfachen Volumen der vorhandenen Lösung entsprechendes Volumen an Dimethylsulfoxid wird zugesetzt und im Zeitraum von etwa 10 Stunden tropfenweise auf die Schichtkörperoberfläche aufgebracht und gezüchtet. Die plättchenförmigen Schichtkörper werden dann wieder gewaschen und in einer Lösung von Albumin (10 $\mu\text{g/ml}$) in einem Phosphatpuffer durch Inkubation nachbehandelt, um die Oberfläche für unspezifische Adsorption zu inaktivieren.

Beispiel 2

Die Trägerplättchen werden mit Epoxysiliciumwasserstoff oder Aminosiliciumwasserstoff wie im Beispiel 1 behandelt. Anschließend wird Dextran an die epoxy- bzw. aminoaktivierte Oberfläche durch Inkubation in einer 20 %-Lösung von Dextran in Wasser gebunden. Hierdurch entsteht ein 20 bis 40 Å dicker Überzug aus Dextran auf der Oberfläche. Alternativ hierzu kann Dextran durch Inkubation mit 0,01 % Natriumperjodat bei pH 8,0, welches in einer Sephadex-G25-Säule entsalzt ist, auf der mit Aminosiliciumwasserstoff beschichteten Oberfläche während etwa 10 Stunden gezüchtet werden. Das gebundene Dextran wird dann stabilisiert, durch Inkubation mit einer 0,1 %igen Natriumborhydridlösung in 0,1 M Acetatpuffer bei pH 5,0. Anschließend wird 0,1 M Natriumhydroxid (10 ml) und 1,4 Butandioldiglycidylether (1 ml) auf die plattenförmigen Trägerkörper im Zeitraum von etwa 10 Stunden aufgebracht, und anschließend wird ebenfalls in einem Zeitraum von etwa 10 Stunden 12 % 2-Aminothiophenol in Aceton den Trägerplättchen zugegeben. Die Trägerplättchen werden dann in Wasser aufbewahrt. Isolierte und reine DNA oder RNA wird dann nach einer Nitridbehandlung der Platten wie im Beispiel 1 auf die Trägerplättchen aufgebracht.

Beispiel 3

Die Trägerplättchen werden mit einer 20 bis 40 Å dicken Schicht aus Dextran, wie im Beispiel 2 beschrieben, beschichtet. Die mit Dextran beschichteten Trägerplättchen werden dann zur Inkubation mit einer Lösung aus 0,2 g Natriumacetat in Wasser (10 ml), welches auch 1 g 1-((m-Nitrobenzyloxy)methyl)pyridiniumchlorid behandelt, anschließend in einem Ofen bei 70 ° C getrocknet und dann bei 140 ° C während etwa einer Stunde gebacken. Die Trägerplättchen werden dann zur Inkubation in einer 20 %igen Lösung von Natriumdithionid behandelt und mit Wasser gewaschen. Ferner werden dann die Trägerplättchen in 1 M Salzsäure, welche 250 µg/ml Natriumnitrid aufweist, etwa eine Stunde lang bei 4 ° C eingetaucht, gewaschen und in einer Befeuchtungskammer aufbewahrt. Abschließend wird dann isolierte, reine DNA bzw. RNA gelöst und durch Züchtung, wie im Beispiel 1 beschrieben, auf die vorstehend behandelten Trägerplättchen aufgebracht.

Im folgenden werden anhand der beiliegenden Figuren Ausführungsbeispiele für bei der Sequenzanalyse von Nucleinsäure verwendbaren Trägern beschrieben.

Bei den in den Figuren 1 bis 3 dargestellten Ausführungsbeispielen handelt es sich um schematische Darstellungen der in Form von Plättchen ausgebildeten Träger, wobei lediglich die Reihenfolge der Anordnung der einzelnen Schichten auf dem Grundkörper veranschaulicht werden soll, ohne daß die Verhältnisse der Schichtdicken der dargestellten Schichtdicken den in der Praxis vorhandenen Maßstäben entsprechen.

In der Fig. 1 befindet sich auf einem Trägergrundkörper 1, der beispielsweise aus Silicium oder Glas bestehen kann, eine Siliciumdioxidschicht 2, welche auch eine Aluminiumoxidschicht sein kann, die als reflektierende Oberfläche wirkt. Auf dieser Schicht befindet sich eine Schicht 3 aus Siliciumwasserstoff mit funktionellen Epoxy- oder Aminogruppen. Darüber befindet sich die Schicht 4, in welcher die auf dem Träger immobilisierte bzw. fixierte einsträngige Nucleinsäure, beispielsweise DNA, vorhanden ist.

Das Ausführungsbeispiel des in der Fig. 2 dargestellten Trägers entspricht im wesentlichen dem in der Fig. 1 und unterscheidet sich demgegenüber lediglich dadurch, daß zwischen der Siliciumwasserstoffschicht 3 und der Schicht 4 mit der fixierten denaturierten einsträngigen Nucleinsäure eine

Polysaccharidschicht 5, insbesondere aus Dextran, angeordnet ist.

Bei dem in der Fig. 3 dargestellten Ausführungsbeispiel ist die reflektierende Oberfläche zweischichtig ausgebildet, wobei die auf dem Grundkörper 1 aufliegende erste Schicht 2' aus Siliciummonoxid und die zweite Schicht 2 aus Siliciumdioxid besteht. Die Wirkungsweise dieser Doppelschicht ist im einzelnen in der DE-OS 32 15 484 beschrieben.

Zusammenfassung

Ein Verfahren zur Sequenzanalyse von Nucleinsäuren, bei dem die zu untersuchende flüssige Probe, welche denaturierte Nucleinsäure aufweist, mit einer lichtreflektierenden Trägeroberfläche in Berührung gebracht wird, die einen an dieser Oberfläche chemisch gebundenen Nucleinsäurestrang mit bestimmter Sequenz aufweist, wobei sich komplementäre Sequenzen der in der Probe befindlichen denaturierten Nucleinsäure mit dem am Träger fixierten Nucleinsäurestrang durch Hybridisierung vereinigen, und das Dickenwachstum der sich dabei auf der Trägeroberfläche bildenden organischen Schicht durch Vergleichsellipsometriemessung oder Änderung der Interferenzerscheinungen an der doppelschichtig ausgebildeten reflektierenden Oberfläche ermittelt wird.

Fig. 1

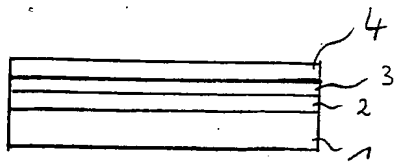


Fig. 2

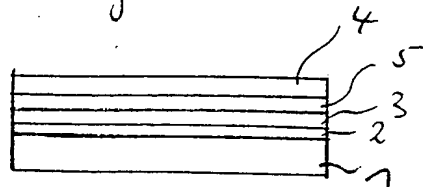


Fig. 3

